

· 临床研究 ·

血清脑源性神经营养因子及酪氨酸激酶受体 B
与新生儿缺氧缺血性脑病的相关性研究

田培超 李建华 陈国洪

【摘要】 目的 探讨血清脑源性神经营养因子(BDNF)及受体酪氨酸激酶(TRKB)与新生儿缺氧缺血性脑病严重程度之间的相关性,从而揭示血清 BDNF 及 TRKB 检测对评价新生儿缺氧缺血性脑病严重程度的临床价值。**方法** 采用随机数字表法抽取缺氧缺血性脑病新生儿 68 例,依循新生儿缺氧缺血性脑病临床分度将其分为轻度 24 例、中度 24 例、重度 20 例,并分别编为 A 组、B 组和 C 组,另选取健康新生儿 18 例,编为 D 组。采用荧光定量 PCR 技术、免疫印迹和酶联免疫法对各组血清中 BDNF 和 TRKB 的转录水平、蛋白表达量及血清浓度进行检测。**结果** A 组、B 组和 C 组中血清 BDNF 和 TRKB 的 mRNA 转录量显著低于 D 组($P < 0.05$),B 组血清 BDNF 和 TRKB 的 mRNA 转录量低于 A 组($P < 0.05$),且 C 组血清 BDNF 和 TRKB 的 mRNA 转录量低于 B 组($P < 0.05$)。A 组、B 组和 C 组中血清 BDNF 和 TRKB 的表达量均显著低于 D 组($P < 0.05$),且 B 组血清 BDNF 和 TRKB 的表达量显著低于 A 组($P < 0.05$),C 组血清 BDNF 和 TRKB 的表达量显著低于 B 组($P < 0.05$)。**结论** BDNF 及 TRKB 因子的相关性检测对区分新生儿缺氧缺血性脑病的严重程度具有潜在的临床价值。

【关键词】 脑源性神经营养因子; 酪氨酸激酶受体 B; 缺氧缺血性脑病; 免疫印迹

新生儿缺氧缺血性脑病是由于各种围产期因素所引起的缺氧、脑血流减少或暂停,从而导致胎儿和新生儿的脑损伤^[1]。脑组织以水肿软化、坏死和出血为主要病变,是新生儿窒息的重要并发症之一,也是导致儿童神经系统伤残的常见原因之一^[2]。新生儿缺氧缺血性脑病重症患者常有后遗症,如脑性瘫痪、智力低下、癫痫、耳聋、视力障碍等。该疾病死亡率高,多数在一周内死亡,存活者症状可持续数周,极大地危害着新生儿的生命健康。因此,寻找一种可在短时间内评价新生儿缺氧缺血性脑病严重程度的方法,有利于临床工作者及时拟定有效的治疗方案,减轻疾病对新生儿生命的危害,预防后遗症发生。为此,本文检测了不同程度缺氧缺血性脑病新生儿血清中脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及酪氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase receptors B, TRKB)的水平,旨在探讨其与新生儿缺氧缺血性脑病严重程度之间的相关性,现报道如下。

对象与方法

一、研究对象

选取 2011 年 3 月至 2012 年 3 月间在我院确诊并治疗的缺氧缺血性脑病新生儿 68 例,依循 1996 年中华医学会儿科学会新生儿学组制订的新生儿缺氧缺血性脑病临床分度^[3]将其分为轻度 24 例、中度 24 例、重度 20 例,并分别编为 A 组、B 组和 C 组,另选取健康新生儿 18 例,编为 D 组。其中,A 组男 13 例,女 11 例,平均体重(3.6 ± 0.9)kg,平均年龄(22.3 ± 1.4)d;B 组男 12 例,女 12 例,平均体重(3.5 ± 1.1)kg,平均年龄(24.6 ± 0.9)d;C 组男 9 例,女 11 例,平均体重(3.4 ± 0.7)kg,平均年龄(24.1 ± 1.1)d;D 组男 9 例,女 9 例,平均体重(3.7 ± 1.1)kg,平

均年龄(23.7 ± 1.2)d。各组性别、平均体重、平均年龄等一般资料比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

纳入标准:①符合 2004 年全国小儿脑性瘫痪专题研讨会提出的小儿脑性瘫痪的定义及诊断标准^[4];②年龄 20 ~ 27 d;③患者家属均签署治疗知情同意书。**排除标准:**①体重 > 4000 g 或 < 2500 g;②患儿母亲年龄 > 35 岁;③伴有其它神经系统疾病;④存在严重的心、肝、肺、肾等重要脏器并发症。

二、研究方法

1. 样本采集:抽取所有入选新生儿的肘静脉血 3 ml,取 1.5 ml 至抗凝的采血管中,用于提取总 mRNA,剩余 1.5 ml 采用不含抗凝剂的采血管收集,于室温下自然凝固 10 ~ 20 min 后,离心 20 min,转速 2000 ~ 3000 r/min,取离心后的上清部分用于 BDNF 及 TRKB 的酶联免疫检测。

2. 荧光定量 PCR:使用由美国 Invitrogen 公司所生产的 Trizol 试剂盒和由美国 Promega 公司所生产的 M-MLV 聚合酶反转录试剂盒,将提取后的 RNA 反转录成 cDNA。A 代表腺嘌呤, G 代表鸟嘌呤, C 代表胞嘧啶, T 代表胸腺嘧啶,序列特异性引物分别为:BDNF-F、BDNF-R、TRKB-F、TRKB-R、 β -actin F 及 β -actin R。BDNF-F 的序列为:5'-CTGCAAACATGTCCATGAGG-3';BDNF-R 的序列为:5'-CCTGCAGCCTTCTTTTGTGT-3';TRKB-F 的序列为:5'-AGCATGAGCACATCCTCAAG-3';TRKB-R 的序列为:5'-ATATGCAGCATCTGCGACTG-3'; β -actin F 的序列为:5'-CCTTCAACACCCAGCCAT-3'; β -actin R 的序列为:5'-TCTTCATTGTGCTGGGTGCCA-3'。利用美国 Bio-Rad 公司生产的 IQ5 PCR 系统进行荧光定量 PCR 检测,于 95 °C 中变性 15 s,共进行 45 个循环(95 °C 中变性 5 s,60 °C 退火 30 s),72 °C 延伸 30 s,最后以 23 Al 法测定实时 PCR 产物的相对量。

3. 酶联免疫:采用 ELISA 试剂盒对制备的血清样本进行检测,采用美国 Biosensis 公司生产的 BEK-2002-2P 型试剂盒和 BEK-2178-2P 型试剂盒分别对 BDNF 和 TRKB 的表达量进行检测。

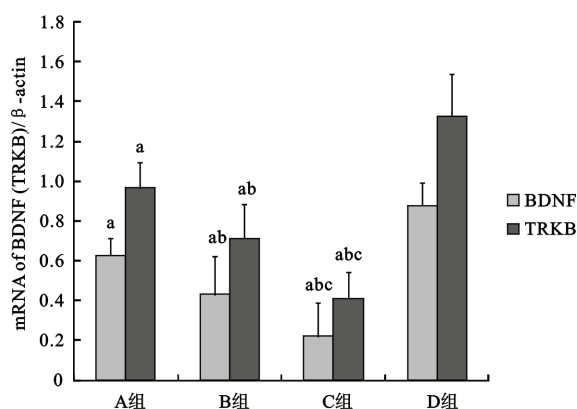
三、统计学分析

采用 SPSS 12.0 版统计学软件进行分析,数据均以($\bar{x} \pm s$)的形式表示,采用单因素多水平分析,即先使用单因子方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)分析整体均数有无差异,再使用最小显著差异法(least-significant difference, LSD)进行两两比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、各组患儿血清中 BDNF 和 TRKB 的 mRNA 转录水平

A 组、B 组和 C 组血清 BDNF 和 TRKB 的 mRNA 转录量显著低于 D 组($P < 0.05$),B 组血清 BDNF 和 TRKB 的 mRNA 转录量低于 A 组($P < 0.05$),且 C 组血清 BDNF 和 TRKB 的 mRNA 转录量低于 B 组($P < 0.05$)。详见图 1。



注:与 D 组比较,^a $P < 0.05$;与 A 组比较,^b $P < 0.05$;与 B 组比较,^c $P < 0.05$

图 1 各组患儿血清中 BDNF 和 TRKB mRNA 的转录水平比较

二、各组患儿血清中 BDNF 和 TRKB 蛋白的表达量

采用 Western blot 法分析 4 组患儿血清中 BDNF 和 TRKB 蛋白的表达量,详见图 2。从图 2 中可以看出,A 组、B 组和 C 组血清 BDNF 和 TRKB 的表达量显著低于 D 组($P < 0.05$),且 B 组血清 BDNF 和 TRKB 的表达量显著低于 A 组($P < 0.05$),C 组血清 BDNF 和 TRKB 的表达量显著低于 B 组($P < 0.05$)。详见图 2、图 3。

三、各组患儿血清中 BDNF 和 TRKB 的 ELISA 检测值

A 组、B 组和 C 组血清中 BDNF 和 TRKB 的 ELISA 检测值显著低于 D 组($P < 0.05$),且 B 组血清中 BDNF 和 TRKB 的 ELISA 检测值显著低于 A 组($P < 0.05$),C 组血清中 BDNF 和 TRKB 的 ELISA 检测值显著低于 B 组($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组患儿血清中 BDNF 和 TRKB 的 ELISA 检测值 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血清 BDNF 浓度	血清 TRKB 浓度
A 组	24	37.18 ± 1.46 ^a	58.24 ± 5.23 ^a
B 组	24	21.37 ± 2.84 ^{ab}	40.11 ± 4.26 ^{ab}
C 组	20	12.77 ± 3.91 ^{abc}	31.93 ± 2.84 ^{abc}
D 组	18	52.21 ± 3.27	62.37 ± 7.33

注:与 D 组比较,^a $P < 0.05$;与 A 组比较,^b $P < 0.05$;与 B 组比较,^c $P < 0.05$

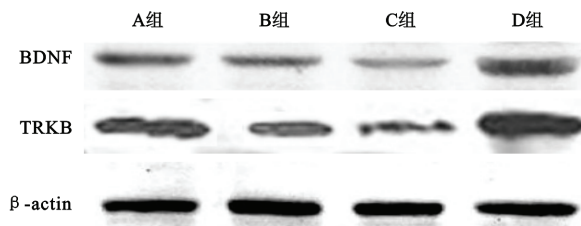
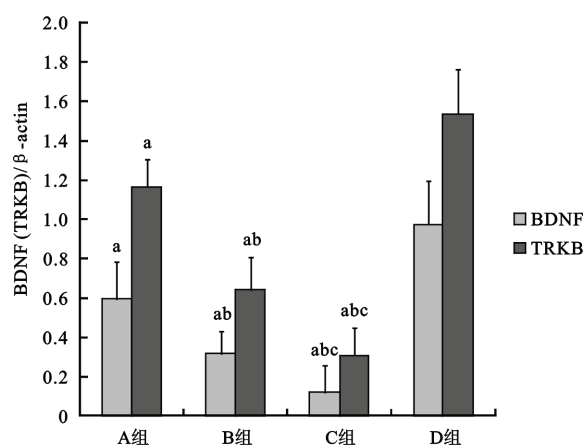


图 2 各组患儿血清中 BDNF 和 TRKB 蛋白的表达量



注:与 D 组比较,^a $P < 0.05$;与 A 组比较,^b $P < 0.05$;与 B 组比较,^c $P < 0.05$

图 3 各组患儿血清中 BDNF 和 TRKB 蛋白表达量的比较结果

讨 论

临床研究总结得出,新生儿发生该疾病的原因主要是:母亲因素、胎盘和脐带异常、分娩用药、产程延长、新生儿自身呼吸状况、循环及中枢神经系统疾病等^[4]。该疾病分为轻度、中度和重度 3 种类型,调查研究发现不同类型对新生儿的生命健康危害程度不同,且后遗症的遗留程度也不同^[5]。轻度在 24 h 内发病,3~5 d 后症状可减轻或消失,很少留有神经系统后遗症;中度于 24~72 h 内发病,1~2 周后可逐渐恢复,但意识模糊进入浅昏迷并持续 5 d 以上者预后差;重度为从出生至 72 h 内发病,死亡率高,幸存者几乎均留有神经系统后遗症。

本文选择了轻度、中度和重度的缺氧缺血性脑病新生儿,采用荧光定量 PCR、免疫印迹和酶联免疫方法来分别检测新生儿血清中 BDNF 及 TRKB 的 mRNA 转录水平、蛋白表达水平和血清浓度。结果显示,在 3 种类型的缺氧缺血性脑病新生儿的血清中,BDNF 和 TRKB 的 mRNA 转录水平、蛋白表达水平和血清浓度均具有显著性差异,且低于健康新生儿血清中的相应值。由此可看出,BDNF 及 TRKB 检测可区分轻度、中度和重度新生儿缺氧缺血性脑病的严重程度,具有潜在的临床诊断价值。

神经生长因子(neurotrophin, NT)是一类由神经支配的组织(如肌肉)和星形胶质细胞产生的蛋白质分子,且其是神经元生长和存活所必需的营养成分^[6]。NT 通常在神经末梢以受体介导入胞的方式进入神经末梢,再经逆向轴浆运输抵达胞体,促进与胞体合成有关的蛋白质产生,从而支持神经元生长、发育,保证其功能的完整性。缺氧缺血性脑病病程中,脑缺血和缺氧

会造成大脑神经发育失常,进而影响 NT 的表达和分泌。此外, BDNF 已被发现确实存在于缺氧缺血性脑病的病程中,且可抑制疾病的进展^[8],但国外有学者提出 BDNF 的表达水平在缺氧缺血性脑病患者的血清中呈现下降趋势,主要是由于大量 BDNF 在脑组织处发挥着功能作用^[9-10]。

TRKB 是 NT 的作用受体,在临床工作中发现其与疾病的发生发展密切相关。有研究报道,TRKB 与前列腺癌和乳腺癌等疾病的发生机制相关^[11-13]。本研究中,缺氧缺血性脑病患儿疾病严重程度越高,其血清中受体的表达量越低。结合受体与肿瘤之间的关系,本研究分析认为,受体与 BDNF 的相互作用可能参与了疾病的发展,所以血清中可溶性的受体量均显著下降,但此项推断仍需通过进一步研究证实,如通过干扰缺氧缺血性脑病小鼠脑细胞中的受体表达,观察小鼠脑细胞的形态和特征发展。

综上所述,血清 BDNF 及 TRKB 与新生儿缺氧缺血性脑病的严重程度呈负相关,且初步证实了血清 BDNF 及 TRKB 的诊断价值。

参 考 文 献

- [1] Shankaran S, Laptook AR, McDonald SA, et al. Temperature profile and outcomes of neonates undergoing whole body hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Crit Care Med*, 2012, 13: 53-59.
- [2] 徐丁. 新生儿缺氧缺血性脑病的发病机理. 兰州医学院学报, 2002, 28: 69-72.
- [3] 中华医学会儿科学分会新生儿组. 新生儿缺血缺氧性脑病诊断依据和分度. 中华儿科杂志, 1997, 35: 99-100.
- [3] 中华医学会儿科学分会神经学组. 2004 年全国小儿脑性瘫痪专题研讨会纪要. 中华儿科杂志, 2005, 43: 261-262.
- [4] Tagin MA, Woolcott CG, Vincier MJ, et al. Hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an updated systematic review and meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2012, 166: 558-566.
- [5] 刘金成, 李金凤, 张红花. 16 排螺旋 CT 在新生儿缺氧缺血性脑病诊断中的价值. 实用临床医学(江西), 2011, 12: 67-68.
- [6] Imbschweiler I, Seehusen F, Peck CT, et al. Increased p75 neurotrophin receptor expression in the canine distemper virus model of multiple sclerosis identifies aldynglial Schwann cells that emerge in response to axonal damage. *Glia*, 2012, 60: 358-371.
- [8] 王雪, 何平. 脑源性神经营养因子在缺氧缺血性脑病中脑保护作用的研究进展. 中国现代医生, 2011, 49: 30-31.
- [9] Imam SS, Gad GI, Atef SH, et al. Cord blood brain derived neurotrophic factor: diagnostic and prognostic marker in fullterm newborns with perinatal asphyxia. *Pak J Biol Sci*, 2009, 12: 1498-1504.
- [10] Aloe L, Iannitelli A. Neurotrophic factors and brain damage in hypoxic-ischemic encephalopathy: a role of nerve growth factor. *Ann Ist Super Sanita*, 2001, 37: 573-580.
- [11] 于垂恭, 李纪鹏, 王映梅, 等. 酪氨酸激酶受体 B 在前列腺癌组织中的表达分析. 现代泌尿外科杂志, 2010, 15: 106-109.
- [12] 莫光泉, 张宏颖, 李连宏. 受体型酪氨酸激酶 RON 在乳腺癌侵袭及转移中的作用研究进展. 大连医科大学学报, 2011, 33: 391-396.
- [13] 赵卫民, 黄光武, 张淑香. 酪氨酸激酶受体 TrKB 与肿瘤的关系. 中国医学文摘: 肿瘤学, 2006, 20: 163-164.

(修回日期: 2013-01-10)
(本文编辑: 凌 琛)

· 短篇论著 ·

康复训练联合生物反馈治疗对脑卒中偏瘫患者下肢功能的影响

冯艳

患者发生脑卒中等脑血管意外后容易遗留偏侧肢体功能障碍,对其运动功能及日常生活活动能力均造成严重影响,因此如何帮助脑卒中偏瘫患者恢复肢体功能对提高其整体康复疗效具有重要意义^[1]。本研究联合采用康复训练及肌电生物反馈治疗脑卒中偏瘫患者,发现临床疗效显著,患者肢体功能及日常生活自理能力均较治疗前明显改善。现报道如下。

一、对象与方法

(一) 研究对象

共选取我院康复门诊收治的脑卒中偏瘫患者 22 例,患者入选标准包括:均符合 1995 年全国第 4 届脑血管病学术会议制订的脑卒中诊断标准^[2],并经颅脑 CT 或 MRI 检查证实;入选时意识清晰,无认知功能障碍;病情稳定,存在单侧肢体运动功能障碍,偏瘫侧下肢肌力在 II 级或 II 级以上,具有控制站立

及行走能力。采用随机数字表法将上述患者分为治疗组及对照组,每组 11 例。治疗组男 8 例,女 3 例;平均年龄(54.3 ± 6.5)岁;平均病程(2.8 ± 0.6)个月;脑梗死 6 例,脑出血 5 例。对照组男 6 例,女 5 例;平均年龄(52.1 ± 7.8)岁;平均病程(2.6 ± 0.8)个月;脑梗死 7 例,脑出血 4 例。2 组患者一般情况及病情经统计学比较,发现组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

(二) 治疗方法

对照组患者给予康复训练,其训练方案为我科根据临床实践制订,以强化肌力、促进肢体伸展及协调能力为主,具体训练内容包括:①侧方行走训练,先向健侧、再向后侧行走,持续训练 5 ~ 10 min;②下蹲训练,患者取站位,手扶固定物以免跌倒,在骨盆放松同时练习下蹲起动作,持续训练 3 ~ 5 min;③双腿屈伸训练,患者取坐位或仰卧位练习双腿屈伸动作,屈腿时双手抱膝尽量屈膝,双脚也尽量背伸,伸腿时双腿尽量伸直,双脚也同时绷直,持续训练 3 ~ 5 min;④患肢负重训练,患者取站立

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.04.020

基金项目:2011 年河南省科技攻关计划项目(112102310180)

作者单位:450002 郑州,郑州大学体育系人体科学实验室